

تهیه آنتی بادی نوترکیب scFv بر ضد پروتئین سطحی P30 توکسوپلازما گوندی

مهدی گلچین^{۱*}، محدثه نخعی مقدم^۲، سعیدرضا نورالهی فرد^۳

خلاصه

مقدمه: توکسوپلازما گوندی (*Toxoplasma gondii*)، انگل داخل سلولی اجباری با شیوع گسترده می باشد که قادر است همه میزبانان خونگرم شامل انسان و حیوانات اهلی را آلوده کند. بیشتر موارد آلودگی در انسان بعد از خوردن گوشت خام یا نیم پز آلوده به کیست های بافتی اتفاق می افتد. بنابراین، روش های گوناگونی برای شناسایی این انگل در مواد غذایی آلوده به کار برده شده است. آنتی بادی های نوترکیب نسل جدیدی از آنتی بادی های مونوکلونال می باشند که اغلب توسط فن آوری نمایش بر روی سطح فاژ از لیبراری های فاژی ایمن یا غیر ایمن علیه آنتی ژن مورد نظر جدا می گردند و از آن ها جهت تشخیص تعداد زیادی از آنتی ژن ها و همچنین امور درمانی استفاده می شود. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی آنتی بادی های مونوکلونال نوترکیب علیه این انگل مهم بود. روش: آنتی ژن سطحی توکسوپلازما گوندی خالص شده P30 روی سطح ایمونوتیوب ها پوشانده شد تا به عنوان یک هدف برای انتخاب آنتی بادی هایی از لیبراری های فاژی تاملینسون I و J نوع scFv استفاده شود. کلون های حامل آنتی بادی های اختصاصی توسط سه مرحله اتصال، جداسازی و تکثیر جدا شد. آنتی بادی های scFv انتخاب شده برای شناخت آنتی ژن فوق توسط آزمایش های ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)، Dot blot و Western blot مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: آنتی بادی های نوترکیبی که قادر به شناخت آنتی ژن P30 با میل ترکیبی بالا بودند، جدا شدند و اختصاصی بودن آن ها تأیید گردید.

نتیجه گیری: آنتی بادی های تک زنجیره ای محلول جدا شده، گزینه های مناسبی برای استفاده در کیت های تشخیصی جهت شناسایی انگل توکسوپلازما گوندی در نمونه های آلوده می باشند.

واژه های کلیدی: آنتی بادی نوترکیب، توکسوپلازما گوندی، scFv، P30

۱- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران ۲- دکتری حرفه ای دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران ۳- دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: golchin@uk.ac.ir

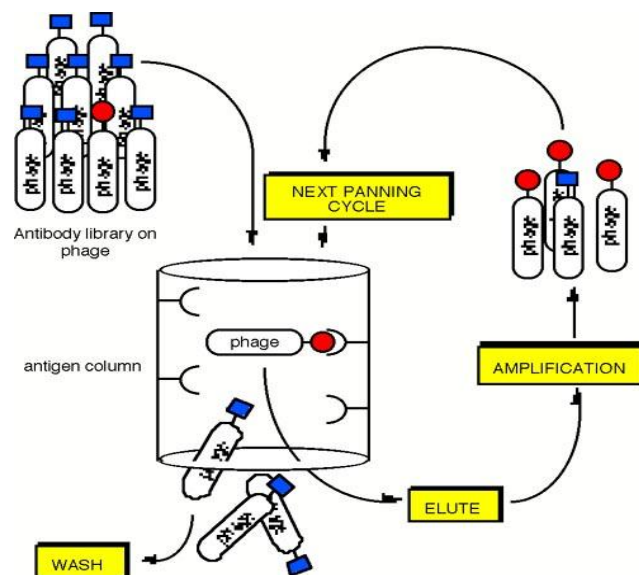
دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۳/۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۳/۹/۹ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۱۷

مقدمه

بیماری توکسوپلاسموز (Toxoplasmosis)، بیماری مشترکی بین انسان و دام با شیوع بسیار گسترده در سراسر جهان می باشد. عامل این بیماری تک یاخته، توکسوپلازما گوندی (*Toxoplasma gondii*) است که می تواند باعث آلودگی انسان از طریق استفاده مواد غذایی و آب آلوده به کیست انگل، خوردن گوشت های نپخته آلوده و همچنین انتقال از طریق جفت به جنین شود. از میان این عوامل، خوردن گوشت های نپخته آلوده در طول دوران بارداری، مهم ترین عامل خطر محسوب می شود. بنابراین با تشخیص صحیح و سریع مواد غذایی آلوده، می توان از مصرف آن ها توسط افراد در معرض خطر مانند زنان باردار و افراد دارای نقص در سیستم ایمنی و وقوع بیماری جلوگیری نمود. روش های تشخیصی مختلفی جهت تشخیص بیماری توکسوپلاسموز و یا آلودگی به انگل توکسوپلازما گوندی انجام شده است که از آن جمله می توان به روش های سرولوژی، تکثیر یک توالی خاص اسید نوکلئیک با روش PCR (Polymerase chain reaction)، روش های بافت شناسی و جداسازی ارگانیزم از نمونه های آلوده اشاره کرد (۱). استفاده از روش های آزمایشگاهی که مبتنی بر به کارگیری آنتی بادی های اختصاصی علیه این تک یاخته هستند، می تواند روشی سریع، ارزان و قابل انجام برای تشخیص نمونه های آلوده در مکان های مختلف باشد (۲، ۳).

امروزه علاوه بر تولید آنتی بادی ها در بدن حیوانات، آن ها را مانند پروتئین های نوترکیب دیگر می توان با کمک روش های مهندسی ژنتیک و با استفاده از وکتورهای خاص و فن آوری های بیولوژی مولکولی، در داخل سلول های باکتری، مخمر، گیاهان و محیط های کشت

سلولی تهیه کرد (۴، ۵). توجه اصلی در این فن آوری، جایگاه محل اتصال آنتی بادی ها با آنتی ژن (نواحی متغیر) می باشد. برای این که امکان تولید مقدار زیادی آنتی بادی در موجودات ساده ای مانند باکتری ها به وجود آید، بقیه ساختمان آنتی بادی ها (نواحی ثابت) حذف گردیده، در بیشتر موارد به دو شکل Fab و scFv ساخته می شود. این دو شکل (Fab و scFv) آنتی بادی های نوترکیب را می توان از روی کلون های سلول های B با استفاده از روش PCR تولید نمود و یا با کلون نمودن تعداد بسیار زیادی (Library) ژن نواحی متغیر آنتی بادی ها در داخل فاژمید و کتورها، به این امر مهم دست یافت (۶). این مجموعه های بسیار بزرگ که به صورت های طبیعی و یا سنتتیک ساخته شده اند، می توانند بر روی سطح باکتریوفاژهایی مانند M13 بیان شوند (۷، ۴). جداسازی آنتی بادی های نوترکیب علیه یک آنتی ژن از دو مرحله اصلی مواجه کردن لیبراری فاژ آنتی بادی با آنتی ژن (Panning) و غربالگری (Screening) تشکیل شده است. طی مرحله اول، لیبراری فاژ آنتی بادی در مجاورت آنتی ژن مورد نظر قرار داده می شود تا پس از اتصال، فاژهای متصل نشده به آنتی ژن طی چندین مرحله شستشو خارج گردند و تنها فاژهای باقی مانده از مرحله رهاسازی (Elution) دوباره به دست آیند. بیشتر این فاژها به طور اختصاصی به آنتی ژن اتصال پیدا می کنند و هر روشی که بتواند فاژهایی را که به آنتی ژن متصل می شوند از آن هایی که متصل نمی شوند، تفکیک نماید، به عنوان روش جداسازی مورد استفاده قرار می گیرد. در مرحله بعد و با انجام غربالگری تعداد زیادی آنتی بادی، آن هایی که خواص مطلوب بیشتری دارند، شناسایی می شوند (شکل ۱) (۴).



شکل ۱. نمای شماتیک مراحل جداسازی فاز آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه آنتی‌ژن مورد نظر (۴)

جداسازی آنتی‌بادی‌های اختصاصی (مونوکلونال) به شکل scFv از لیبراری‌های تاملینسون I و J علیه آنتی‌ژن سطحی P30 توکسوپلازما گوندی و ارزیابی فعالیت تعدادی از کلون‌های جدا شده علیه این آنتی‌ژن بود تا در آینده بتوان از آنتی‌بادی‌های اختصاصی احتمالی جدا شده جهت موارد تشخیصی مواد غذایی آلوده به این انگل استفاده نمود.

روش بررسی

این مطالعه تحقیقی در سال ۹۱-۱۳۹۰ در محل دانشکده دام پزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان صورت گرفت. در این تحقیق از آنتی‌ژن خالص P30 تک یاخته توکسوپلازما گوندی (Serotec, UK) استفاده گردید. رقت‌های مختلف از این پروتئین که به صورت لیوفیلیزه ارسال شده بود، با استفاده از محلول PBS (Phosphate buffered saline) تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت.

از لیبراری‌های scFv آنتی‌بادی تاملینسون I و J مربوط به مرکز مهندسی پروتئین شورای تحقیقات پزشکی (Medical Research Council یا MRC) کمبریج انگلستان که هر کدام

لیبراری‌های تاملینسون I و J یکی از جدیدترین لیبراری‌های نیمه ساختگی هستند که به وسیله مرکز مهندسی پروتئین شهر کمبریج (انگلستان) توزیع شده‌اند. هر لیبراری شامل بیش از ۱۰۰ میلیون ژن scFv متفاوت می‌باشد که در یک فازمید وکتور مقاوم به آمپی‌سیلین که مشتق از وکتور pHEN1 است و pIT2 نامیده می‌شود، کلون شده است (۸). این لیبراری‌ها را می‌توان با استفاده از فن‌آوری نمایش روی سطح فاز و همچنین روش‌های معمول جداسازی، برای به دست آوردن scFv علیه هر مولکول هدفی استفاده کرد. از scFv‌های جدا شده برای کاربردهای مشابه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مانند ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)، Western blot، FACS (Fluorescence-activated cell sorting)، ایمونوشیمی و... استفاده می‌گردد (۹-۱۱).

با توجه به در اختیار داشتن لیبراری‌های تاملینسون I و J و عدم تولید آنتی‌بادی‌های نو ترکیب از نوع scFv علیه آنتی‌ژن سطحی P30 توکسوپلازما گوندی و همچنین مزایای این نوع آنتی‌بادی‌ها، هدف از انجام تحقیق حاضر

بیش از ۱۰۰ میلیون تنوع داشت و ژن آن ها در فازمید و کتور pIT2 کلون شده بود، استفاده گردید. به همراه این لیبراری ها، سلول های باکتریایی اشیریشیا کلی سویه TG1 (جهت تکثیر فاز آنتی بادی) و سویه HB2151 برای تولید scFv های محلول و همچنین، فاز کمکی KM13 و یک نسخه از دستورالعمل مربوط ارسال شده بود (۸).

مطابق دستورالعمل مربوط به استفاده از لیبراری ها (۸) و به منظور جداسازی فاز آنتی بادی های اختصاصی از هر لیبراری، ایمونوتیوب ها (Nunc, Denmark) با ۴ میلی لیتر آنتی ژن P30 (غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد پوشانده شدند. پس از شستشوی ایمونوتیوب ها با محلول PBS، فضاهای خالی بر روی سطح آن ها با افزودن بافر مسدود کننده (Maravel, UK) (MPBS) Milk Phosphate-Buffered Saline ۴ درصد مسدود گردید. سپس ۱۰^{۱۳} فاز آنتی بادی از هر لیبراری (که از قبل با بافر مسدود کننده مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شده بود) به ایمونوتیوب مربوط اضافه شد. لوله ها بعد از ۲ ساعت، ۲۰ مرتبه با محلول PBS/Tween20 شستشو گردیدند تا فاز آنتی بادی هایی که نمی توانستند به آنتی ژن اتصال یابند، از محیط ایمونوتیوب ها خارج شود.

در مرحله بعد، رهاسازی فاز آنتی بادی های اتصال یافته با افزودن آنزیم تریپسین به غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر انجام شد و به دنبال آن سلول های باکتریایی سویه TG1 با این فازها آلوده گردید. جهت تکثیر فازهای رهاسازی شده در داخل سلول باکتری، فاز کمکی KM13 اضافه شد و فاز آنتی بادی های تکثیر شده برای دور بعدی جداسازی مورد استفاده قرار گرفت. در مجموع برای به دست آوردن آنتی بادی های دارای میل ترکیبی بالا و اختصاصی، سه مرحله جداسازی انجام شد. تیتراژهای اضافه شده و رهاسازی شده در هر دور از جداسازی با آلوده کردن

سلول های باکتریایی سویه TG1 و شمارش تعداد کلنی ها بر روی محیط آنتی بیوتیک دار TYE انجام گرفت. برای تهیه scFv های محلول (بدون فاز) از فاز آنتی بادی های به دست آمده از دورهای دوم و سوم جداسازی، سلول باکتری اشیریشیا کلی سویه HB2151 مورد استفاده قرار گرفت (۸). در این سویه باکتریایی بعد از ژن آنتی بادی، کدون TAG به عنوان کدون خاتمه شناخته می شود و بنابراین ساخت فاز انجام نمی گیرد. بدین منظور ۲۰۰ میکرولیتر از سویه باکتری HB2151 که در مرحله رشد لگاریتمی قرار داشت، با ۱۰ میکرولیتر از فازهای رهاسازی شده مربوط به دور دوم و سوم هر لیبراری آلوده گردید و باکتری های مذکور بر روی محیط جامد TYE حاوی آنتی بیوتیک کشت داده شد.

جهت ارزیابی کلون های دورهای دوم و سوم جداسازی در شناخت آنتی ژن P30 توکسوپلازما گوندی با آزمایش مونوکلونال ELISA، ۱۶ کلونی مربوط به دور دوم و ۳۱ کلونی مربوط به دور سوم جداسازی از هر لیبراری در خانه های یک پلیت کشت سلول ۹۶ خانه ای استریل حاوی محیط 2xTY و آمپی سیلین کشت داده شد و پس از رسیدن به مرحله رشد لگاریتمی، محلول IPTG (Isopropyl-beta-D-) thiogalactopyranoside) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار اضافه شد تا scFv های محلول در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بیان گردند.

به طور هم زمان ۹۴ خانه از یک پلیت ELISA با قدرت جذب بالا (Nunc, Denmark) و غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر با آنتی ژن P30 توکسوپلازما گوندی، یک خانه از پلیت با پروتئین BSA (Bovine serum albumin) (Merck, Germany) و یک خانه دیگر با scFv ضد آنتی ژن K99 به عنوان کنترل منفی آنتی ژن پوشانده شد و سپس با محلول ۳ درصد BSA بلوک گردید. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از مایع محیط کشت واجد scFv های محلول به خانه مربوط بر

نیتروسولوزی با استفاده از آنتی بادی ضد c-myc و آنتی بادی ضد ایمونوگلوبولین های موشی متصل به آنزیم HRP با غلظت ۱ در ۲۰۰۰ و همچنین، استفاده از سوبسترای (Sigma, USA) 4-chloro-1-naphtol انجام گرفت.

جهت سنجش وجود ژن های کامل scFv (قطعات VH و VL) در ۸ کلون انتخاب شده از لیبراری های تاملینسون I و J، آزمایش PCR بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از این کلون ها به وسیله کیت استخراج پلاسمید (Bioneer, Korea) و با استفاده از آغازگرهای LMB3 (5'-pHEN seq و 3'-CTATGCGGCCCCATTCA) (۸) و دستگاه ترموسایکلر (BioRad, USA Minicycler) انجام گردید.

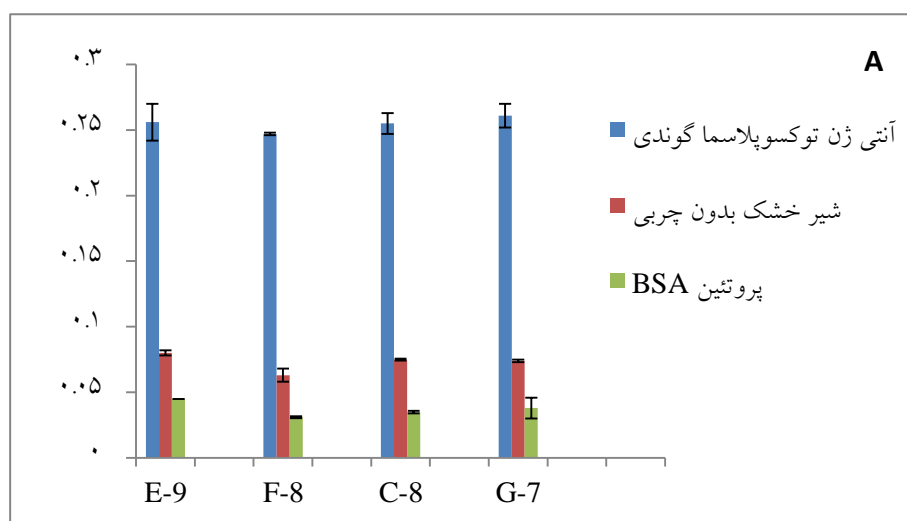
نتایج

آزمایش ELISA: پس از سه مرحله جداسازی از میان لیبراری های تاملینسون I و J فعالیت ۴۷ کلون از هر لیبراری در تولید آنتی بادی های نوع scFv علیه پروتئین P30 تک یاخته توکسوپلازما گوندی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج این مرحله نشان داد که حدود نیمی از کلون های مورد بررسی که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند، توانستند با آنتی ژن مورد نظر از هر کدام از لیبراری ها واکنش دهند و واکنش رنگی در آزمایش ELISA را با شدت و ضعف مختلفی نشان دادند. از آنجا که امکان انجام واکنش تعدادی از این کلون ها با پروتئین MPBS (محلول بلوک کننده طی مراحل جداسازی) وجود داشت، آزمایش ELISA دیگری با ۴ کلون از هر لیبراری (در مجموع ۸ کلون) و با استفاده از آنتی ژن P30، MPBS و پروتئین BSA به صورت دو گانه انجام شد. در شکل های ۲ و ۳ شدت واکنش ایجاد شده نسبت به هر یک از پروتئین ها نشان داده شده است.

روی پلیت ELISA انتقال داده شد. آنتی بادی های اتصال یافته با استفاده از آنتی بادی ضد c-myc (Roche, Germany) و آنتی بادی ضد ایمونوگلوبولین های موشی متصل به آنزیم HRP (Horseradish peroxidase) (Sigma, USA) با غلظت ۱ در ۲۰۰۰ و سوبسترای (Tetramethylbenzidine) TMB (Sigma, USA) تشخیص داده شدند.

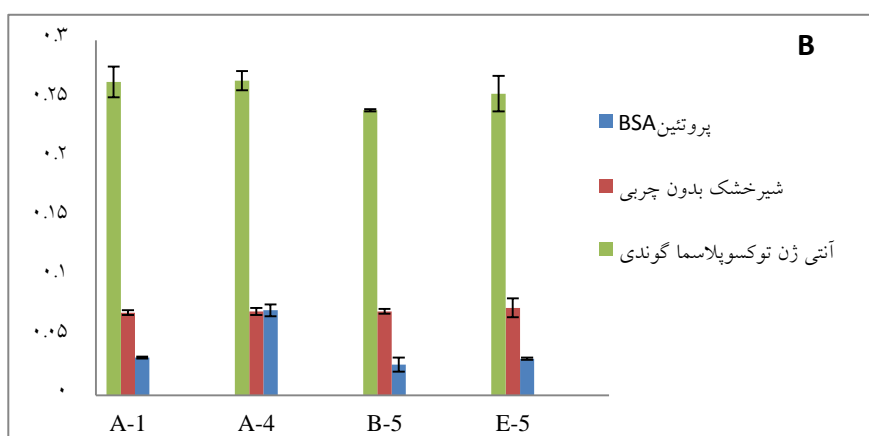
به منظور پی بردن به عملکرد اختصاصی کلون های انتخابی و به دنبال آزمایش فوق، آزمایش ELISA دیگری بر روی ۴ کلون از هر لیبراری که بیشترین واکنش را با آنتی ژن داشتند، انجام شد. در این آزمایش با استفاده از آنتی ژن های P30، محلول ۲ درصد شیر خشک بدون چربی در (MPBS) PBS به عنوان کنترل منفی آنتی ژن و محلول ۳ درصد BSA به عنوان کنترل منفی آنتی ژن دیگر، به صورت دو گانه و مشابه روش مذکور انجام گرفت.

برای انجام آزمایش Dot blot، ۳ میکرولیتر آنتی ژن P30 و ۳ میکرولیتر پروتئین ۳ درصد BSA به صورت نقطه ای بر روی ۸ قطعه غشای نیتروسولوزی (Schleicher and Schuell, Germany) ریخته شد. جهت انجام آزمایش Western blot مطابق دستورالعمل استاندارد آن (۱۲)، آنتی ژن P30 در ۸ چاهک از یک ژل SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-) (Polyacrylamide gel electrophoresis) رانده شد و سپس با استفاده از دستگاه (Mini-PROTEAN 3) (BioRad, USA) به غشای نیتروسولوزی منتقل گردید. در ادامه تمام غشاهای نیتروسولوزی با استفاده از محلول ۲ درصد MPBS بلوک شده، سپس به آن ها scFv آنتی بادی های مربوط به ۸ کلون مختلف از مرحله جداسازی (که بیشترین واکنش را در آزمایش ELISA با آنتی ژن نشان داده بودند)، به صورت جداگانه اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تشخیص واکنش بین scFv های محلول با آنتی ژن قرار گرفته بر روی غشاهای



شکل ۲. واکنش بهترین آنتی‌بادی‌های محلول از نوع scFv از لیبراری I با آزمایش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) علیه آنتی‌ژن P30 خالص توکسوپلازما گوندی و شیر خشک بدون چربی و پروتئین BSA (Bovine serum albumin)

BSA: Bovine serum albumin

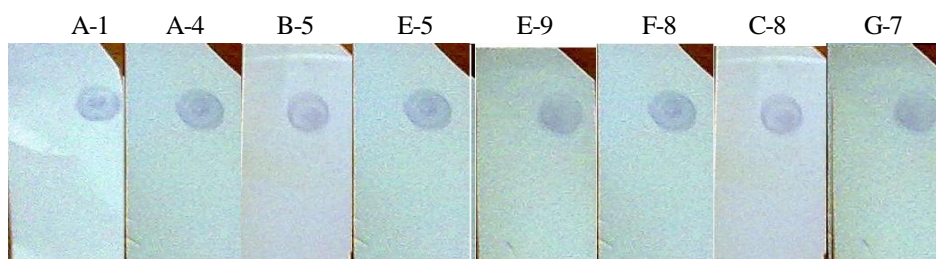


شکل ۳. واکنش بهترین آنتی‌بادی‌های محلول از نوع scFv از لیبراری J با آزمایش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) علیه آنتی‌ژن P30 خالص توکسوپلازما گوندی و شیر خشک بدون چربی و پروتئین BSA (Bovine serum albumin)

BSA: Bovine serum albumin

آبی رنگ روی کاغذ نیتروسلولزی در مکانی که آنتی‌ژن توکسوپلازما گوندی ریخته شده بود، ایجاد شد و نشان داد که واکنش آنتی‌ژن توکسوپلازما گوندی با scFv آنتی‌بادی‌های ضد این آنتی‌ژن می‌باشد.

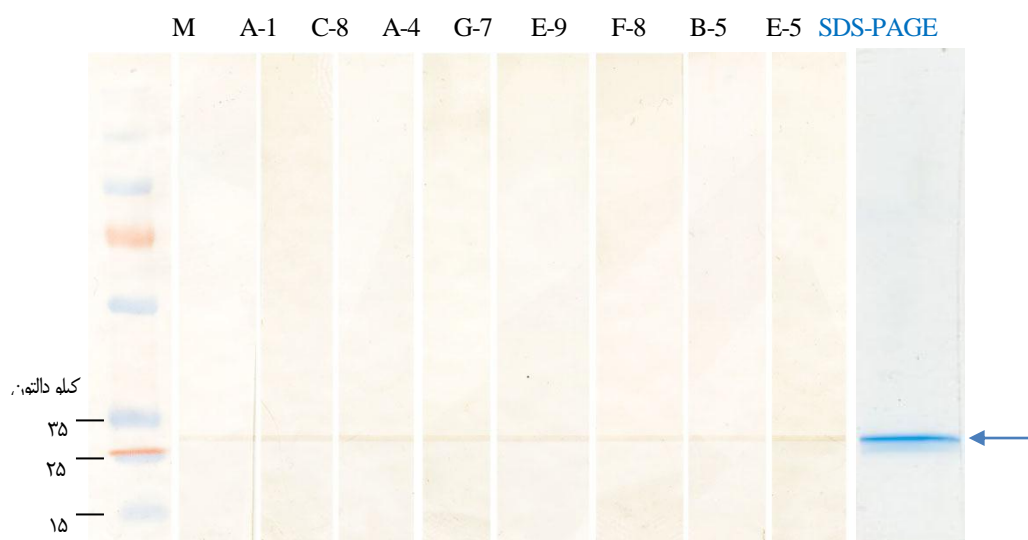
آزمایش Dot blot: این آزمایش به منظور تأیید کلونی‌های انتخاب شده، بررسی آن‌ها در مورد شناخت آنتی‌ژن توکسوپلازما گوندی و تأیید آزمایش ELISA انجام شد. همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، لکه



شکل ۴. آزمایش Dot blotting با کلون‌های انتخاب شده نسبت به شناخت آنتی‌ژن توکسوپلازما گوندی

قادر هستند اپی‌توپ‌های خطی را شناسایی نمایند. بنابراین، حفظ ساختار سه بعدی آنتی‌ژن در عملکرد این آنتی‌بادی‌ها جهت شناسایی آن دخالت ندارد (شکل ۵).

آزمایش Western blot: این آزمایش که به منظور شناسایی آنتی‌بادی‌ها نسبت به فرم خطی این آنتی‌ژن انجام گرفت، نشان داد که تمام آنتی‌بادی‌های جدا شده انتخابی

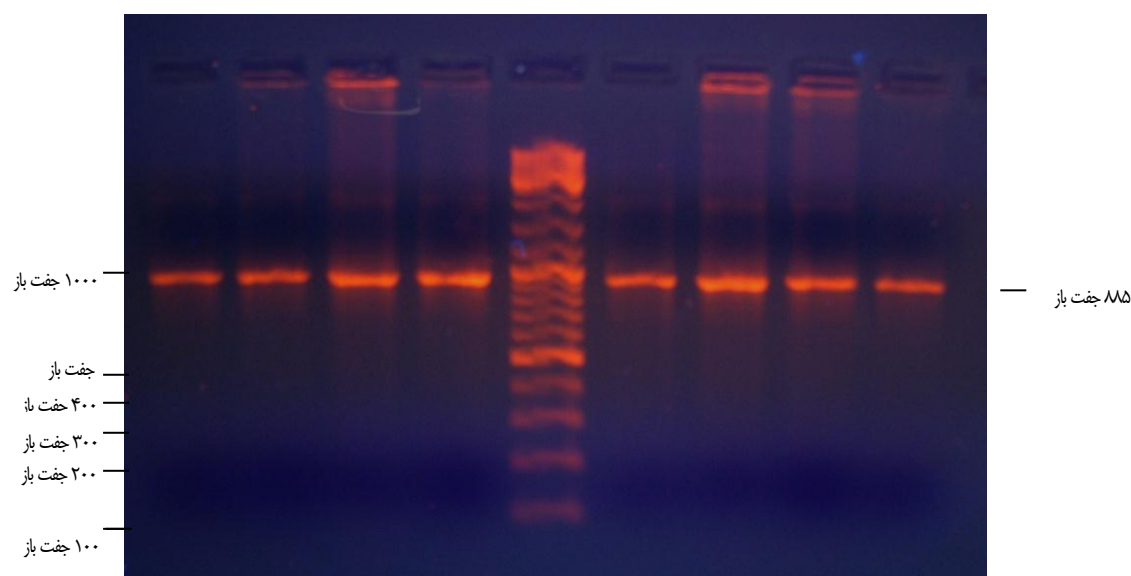


شکل ۵. نتایج حاصل از الکتروفورز آنتی‌ژن توکسوپلازما بر روی SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis) (سمت راست) و ردیابی ایمونولوژیک آن با آنتی‌بادی‌های حاصل از کلون‌های مختلف در آزمایش Western blot

ستون M: نشانگر PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, Lithuania)

کلون‌های رشد یافته بود. همان‌گونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، با استفاده از پرایمرهای PHENseq و LMB3، قطعه‌ای به طول ۸۸۵ جفت باز تکثیر گردید.

آزمایش PCR: نتایج تکثیر ژن کد کننده آنتی‌بادی نو ترکیب ضد پروتئین سطحی انگل توکسوپلازما گوندی از روی پلاسمیدهای حامل این ژن مربوط به ۸ کلون انتخابی با روش PCR، نشان دهنده وجود این ژن در همه



شکل ۶. بررسی کلون‌های انتخابی از لحاظ داشتن ژن scFv با روش PCR (Polymerase chain reaction)

ستون M: نشانگر ۱۰۰ Plus جفت باز (Fermentas, Lithuania)

بحث

(Immunosorbent agglutination assay) نشان داده است که عوامل خطر بروز بیماری توکسوپلاسموز در این زنان، به استفاده از گوشت نپخته و تماس با خاک و مسافرت‌های خارجی ارتباط دارد. همچنین، بررسی‌ها نشان داده است که ۳-۶۳ درصد عامل این بیماری در زنان باردار مربوط به مصرف گوشت نپخته و نمک زده است و ۶-۱۷ درصد آلودگی‌ها به تماس با خاک ارتباط دارد (۱۴). تحقیقات متعدد انجام شده در کشور ما نیز سطح بالای آلودگی دام‌ها در نقاط مختلف را نشان می‌دهد (۱۶، ۱۵). از جمله این تحقیقات می‌توان به مطالعه ضیاء علی و همکاران در شمال ایران (استان مازندران و گیلان) اشاره کرد که تأثیر وجود آنتی‌بادی ضد انگل این بیماری را در سرم گوسفندان، بزها و جوجه‌ها بررسی نمود. آنان شیوع این عامل بیماری‌زا را در گوسفندان، بزها و جوجه‌ها به ترتیب ۳۲/۵، ۱۴/۳ و ۵۱/۰ درصد تخمین زدند و احتمال دادند که تیت‌ر بالای آنتی‌بادی در جوجه‌ها به علت رطوبت زیاد هوا است که اووسیست انگل می‌تواند تا مدت‌ها زنده باقی بماند (۱۵).

اگرچه بیماری توکسوپلاسموز در افراد سالم اغلب بدون علائم و به صورت مزمن مشاهده می‌شود، اما این بیماری می‌تواند برای جنین مادران بارداری که در طول دوره بارداری آلوده به انگل توکسوپلاسمما گوندی می‌شوند و همچنین بیماران دارای نقص سیستم ایمنی بسیار خطرناک باشد و باعث عوارضی مانند سقط جنین، کوری و نقایص مختلف مغزی گردد. همان‌گونه که ذکر گردید، مهم‌ترین عامل در بروز بیماری، مصرف مواد غذایی آلوده و به خصوص گوشت‌های نپخته و یا خوب حرارت ندیده آلوده به این انگل می‌باشد. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که میزان آلودگی به انگل توکسوپلاسمما گوندی شیوع گسترده‌ای در جهان دارد؛ به طوری که تخمین اپیدمیولوژی بیماری توکسوپلاسموز در انسان از گستره ۱۱ درصد در ایالات متحده آمریکا تا ۷۰ درصد در کشور برزیل متفاوت است (۱۳).

بررسی منبع آلودگی زنان باردار در اروپا با استفاده از روش‌های IFA (Indirect fluorescent antibody) و ISAGA

مونوکلونال نو ترکیبی نوع scFv از میان لیبراری‌های نیمه سنتتیک تاملینسون I و J علیه آنتی ژن سطحی توکسوپلازما گوندی (پروتئین P30 یا SAG1) جداسازی گردد.

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که بعد از سه مرحله جداسازی از هر کدام از لیبراری‌های تاملینسون، تعداد ۴۷ کلنی از جهت تولید آنتی‌بادی‌های محلول علیه آنتی ژن مذکور مورد بررسی قرار گرفت و آنتی‌بادی‌های ساخته شده توسط نیمی از کلون‌ها قادر به شناسایی آنتی ژن در آزمایش ELISA بودند. از این تعداد، ۸ کلون با نام‌های A-1، C-8، A-4، G-7، E-9، F-8، B-5 و E-5 که واکنش بیشتری را نسبت به آنتی ژن نشان می‌دادند، انتخاب شدند. فعالیت این کلون‌ها دوباره در آزمایش‌های ELISA و Dot blot مورد سنجش قرار گرفت و تأیید شد. آزمایش Western blot که جهت پی بردن به شناسایی آنتی‌بادی‌ها نسبت به فرم خطی این آنتی ژن انجام گرفت، نشان داد که تمام آنتی‌بادی‌های جدا شده انتخابی قادر به شناسایی اپی‌توپ یا اپی‌توپ‌هایی هستند که آنتی ژن خطی شده (که ساختار فضایی آن در هنگام تهیه ژل الکتروفورز باز گردیده است)، واجد آن (آنها) می‌باشد. به دلیل این که در هنگام ساخت و تهیه لیبراری‌ها این امکان وجود دارد که ژن آنتی‌بادی به صورت کامل کلون نشود و جهت اطمینان از این که آنتی‌بادی‌های جدا شده دارای قطعات کامل VH و VL هستند، آزمون PCR بر روی تعدادی از این کلون‌ها انجام گرفت که وجود این قطعات (دارای ۸۸۵ جفت باز) در مورد کلون‌های انتخاب شده تأیید گردید.

بنابراین می‌توان از هر کدام از آنتی‌بادی‌های فوق در تشخیص نمونه‌های آلوده به تک یاخته توکسوپلازما گوندی از جمله نمونه‌های گوشت آلوده در آزمایش‌های مختلف استفاده نمود. از جمله روش‌های تشخیصی سریع برای این آنتی ژن، به کارگیری آن‌ها در کیت‌های تشخیصی از جمله کیت‌های لاتکس آگلوتیناسیون و ایمنو کروماتوگرافی می‌باشد که تاکنون در این زمینه

مطالعه دیگری نیز در مورد شیوع بیماری توکسوپلاسموز و وجود انگل در بافت‌های مختلف گوسفندان و بزهای استان فارس انجام گرفت و در آن از بافت‌های مغز، زبان، کبد، ماهیچه بین دنده‌ای، ماهیچه ران و گردن گوسفند و بز نمونه‌گیری به عمل آمد. با استفاده از روش PCR نشان داده شد که میزان وجود عامل بیماری‌زای این بیماری در بز ۲۲/۷ درصد و در گوسفند ۳۷/۵ درصد می‌باشد. همچنین، بیشترین میزان آلودگی در بافت‌های مغز و زبان و کمترین میزان در کبد یافت شد (۱۶).

چنانچه هدف، پیشگیری از وقوع این بیماری در افراد حساس باشد، یکی از مهم‌ترین راهکارها، تشخیص نمونه‌های غذایی آلوده به اشکال مختلف بیماری‌زای انگل توکسوپلازما گوندی و جلوگیری از مصرف آن‌ها توسط افراد در معرض خطر است. تاکنون روش‌های تشخیصی مختلفی برای این منظور طراحی و به صورت آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته است که می‌توان با استفاده از آن‌ها، نمونه‌های سالم و آلوده را از هم تفکیک نمود. از آن جمله می‌توان به روش‌های PCR، Nested PCR، Real-Time PCR و ایزولاسیون انگل در حیوانات آزمایشگاهی اشاره نمود (۱۹-۱۷، ۱۵). روش‌های مذکور اگرچه از حساسیت بسیار بالایی در تشخیص برخوردارند، اما استفاده از آن‌ها در اغلب موارد وقت گیر، پرهزینه و نیازمند امکانات آزمایشگاهی خاص می‌باشد. بنابراین، تحقیق حاضر با هدف دستیابی به روشی ساده‌تر، کم‌هزینه‌تر و قابل انجام در همه مکان‌ها انجام گرفت.

با توجه به اختصاصیت زیاد آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای تشخیص آنتی ژن‌ها در روش‌هایی مانند ELISA، لاتکس آگلوتیناسیون (Latex agglutination) و ایمنو کروماتوگرافی و همچنین، تهیه بسیار آسان‌تر و ارزان‌تر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نو ترکیب نسبت به نوع موشی آن‌ها، از تکنیک نمایش قطعات آنتی‌بادی بر روی سطح فاژ استفاده گردید تا با استفاده از آن، آنتی‌بادی

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با همکاری حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان و حمایت مالی بنیاد ملی نخبگان ایران انجام گرفت که بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی از آنان به عمل می آید.

استفاده نشده‌اند. این روش‌ها جزء روش‌های ساده، ارزان و قابل استفاده در هر مکان و بدون نیاز به تجهیزات گرانقیمت می‌باشند. علاوه بر این، تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب با غلظت بالا می‌تواند با استفاده از وکتورهای بیانی قوی مانند وکتورهای pET در باکتری اشریشیا کلی انجام شود که هزینه تولید آن‌ها را بسیار کمتر می‌کند (۲۱، ۲۰).

References

1. Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2002; 185(Suppl 1): S73-S82.
2. Ogouyemi-Hounto A, Agbayahoun-Chokki F, Sissinto Savi de TY, Biokou BB, Adinsi dS, V, Assogba M, et al. [Evaluation of a rapid diagnostic test in the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women in Cotonou (Benin)]. *Bull Soc Pathol Exot* 2014; 107(2): 85-9.
3. Chong CK, Jeong W, Kim HY, An DJ, Jeoung HY, Ryu JE, et al. Development and clinical evaluation of a rapid serodiagnostic test for toxoplasmosis of cats using recombinant SAG1 antigen. *Korean J Parasitol* 2011; 49(3): 207-12.
4. Hoogenboom HR, de Bruinea AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 1998; 4(1): 1-20.
5. Geyer CR, McCafferty J, Dubel S, Bradbury AR, Sidhu SS. Recombinant antibodies and in vitro selection technologies. *Methods Mol Biol* 2012; 901: 11-32.
6. Bradbury AR, Marks JD. Antibodies from phage antibody libraries. *J Immunol Methods* 2004; 290(1-2): 29-49.
7. Somnavilla R, Lovato V, Villa A, Sgier D, Neri D. Design and construction of a naive mouse antibody phage display library. *J Immunol Methods* 2010; 353(1-2): 31-43.
8. Tomlinson I&J libraries protocol. Available at: [Http://www.geneservice.co.uk/products/p-roteomic/datasheets/tomlinsonIJ.pdf](http://www.geneservice.co.uk/products/p-roteomic/datasheets/tomlinsonIJ.pdf).
9. Caravelli A, Luz DE, Andrade FB, Moraes CT, Maranhao AQ, Piazza RM. Sensitive and specific detection of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* using recombinant anti-intimin antibody by immunofluorescence assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77(4): 301-3.
10. Hairul Bahara NH, Tye GJ, Choong YS, Ong EB, Ismail A, Lim TS. Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals* 2013; 41(4): 209-16.
11. Weissner NE, Hall JC. Applications of single-chain variable fragment antibodies

- in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol Adv* 2009; 27(4): 502-20.
12. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, NY: CSHL Press; 2001.
 13. Munoz-Zanzi CA, Fry P, Lesina B, Hill D. Toxoplasma gondii oocyst-specific antibodies and source of infection. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(10): 1591-3.
 14. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ* 2000; 321(7254): 142-7.
 15. Zia-Ali N, Fazaeli A, Khoramizadeh M, Ajzenberg D, Darde M, Keshavarz-Valian H. Isolation and molecular characterization of Toxoplasma gondii strains from different hosts in Iran. *Parasitol Res* 2007; 101(1): 111-5.
 16. Asgari Q, Sarnevesht J, Kalantari M, Sadat SJ, Motazedian MH, Sarkari B. Molecular survey of Toxoplasma infection in sheep and goat from Fars province, Southern Iran. *Trop Anim Health Prod* 2011; 43(2): 389-92.
 17. Ergin S, Ciftcioglu G, Midilli K, Issa G, Gargili A. Detection of toxoplasma gondii from meat and meat products by the nested-pcr method and its relationship with seroprevalence in slaughtered animals. *Bull Vet Inst Pulawy* 2009; 53: 657-61.
 18. Aspinall TV, Marlee D, Hyde JE, Sims PF. Prevalence of Toxoplasma gondii in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction--food for thought? *Int J Parasitol* 2002; 32(9): 1193-9.
 19. Dubey JP, Hill DE, Jones JL, Hightower AW, Kirkland E, Roberts JM, et al. Prevalence of viable Toxoplasma gondii in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *J Parasitol* 2005; 91(5): 1082-93.
 20. Golchin M, Khalili-Yazdi A, Karamouzian M, Abareghi A. Latex agglutination test based on single-chain Fv recombinant antibody fragment. *Scand J Immunol* 2012; 75(1): 38-45.
 21. Spadiut O, Capone S, Krainer F, Glieder A, Herwig C. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends Biotechnol* 2014; 32(1): 54-60.

Recombinant scFv Antibodies against P30 Surface Protein of *Toxoplasma Gondii*

Mehdi Golchin, Ph.D.^{1*}, Mohadeseh Nakhaei-Moghadam, D.V.M.², Saeid Reza Nouroollahi-Fard, Ph.D.³

1. Associate Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
2. Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
3. Associate Professor, Department of Parasitology, School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

* Corresponding author; e-mail: golchin@uk.ac.ir

(Received: 23 May 2014 Accepted: 7 Jan. 2014)

Abstract

Background & Aims: *Toxoplasma gondii* is an obligate, intracellular parasite, which is widely spread in the world. The parasite is able to infect all warm-blooded hosts including humans and farm animals. The infection in humans often occurs after the ingestion of raw or undercooked meat containing tissue cysts. Several methods have been applied to detect this parasite in contaminated foods. Recombinant antibodies are new generation of monoclonal antibodies, which are isolated via phage display technology from immune or non-immune phage libraries against target antigens. These antibodies are used for diagnosis of many different antigens and therapeutics proposes. The object of the present study was to isolate recombinant monoclonal antibodies against this important parasite.

Methods: The purified *Toxoplasma gondii* surface antigen, P30, was coated to immunotubes and used as a target for selection of antibodies from the Tomlinson I and J phage display libraries of single-chain fragment variable (scFv) antibodies. Clones that were able to recognize antigen were isolated in three rounds of binding, elution and amplification. The specificity of scFv antibodies chosen from the resulting panel, were confirmed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot blotting and western blotting methods.

Results: Recombinant antibodies capable of recognizing P30 antigen were isolated with high affinity; and their specificity was approved.

Conclusion: Isolated soluble single chain antibodies are good candidates to apply as monoclonal recombinant antibodies in diagnostic kits for detection of *Toxoplasma gondii* in contaminated samples.

Keywords: Recombinant antibody, *Toxoplasma gondii*, Single-chain fragment variable (scFv), P30